

⑤1

Int. Cl. 2:

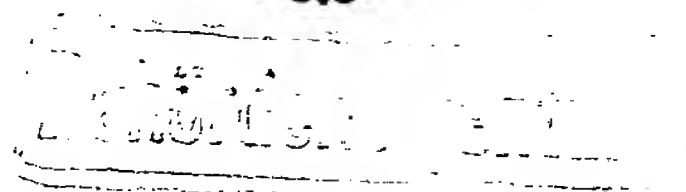
**A 61 K 31/215**

①9 **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**DEUTSCHES**



**PATENTAMT**



**DE 28 40 259 A 1**

①1

# **Offenlegungsschrift 28 40 259**

②1

Aktenzeichen:

P 28 40 259.7

②2

Anmeldetag:

15. 9. 78

④3

Offenlegungstag:

29. 3. 79

③0

Unionspriorität:

③2 ③3 ③1

15. 9. 77 Großbritannien 38546-77

⑤4

Bezeichnung:

Cytostatische Mittel und ihre Verwendung

⑦1

Anmelder:

Biorex Laboratories Ltd., London

⑦4

Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys. Dr.;  
Weickmann, F.A., Dipl.-Ing.; Huber, B., Dipl.-Chem.; Liska, H., Dr.-Ing.;  
Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦2

Erfinder:

Gottfried, Siegfried, Barnet, Hertfordshire; Baxendale, Lily,  
London (Großbritannien)

**DE 28 40 259 A 1**

F.3750/P

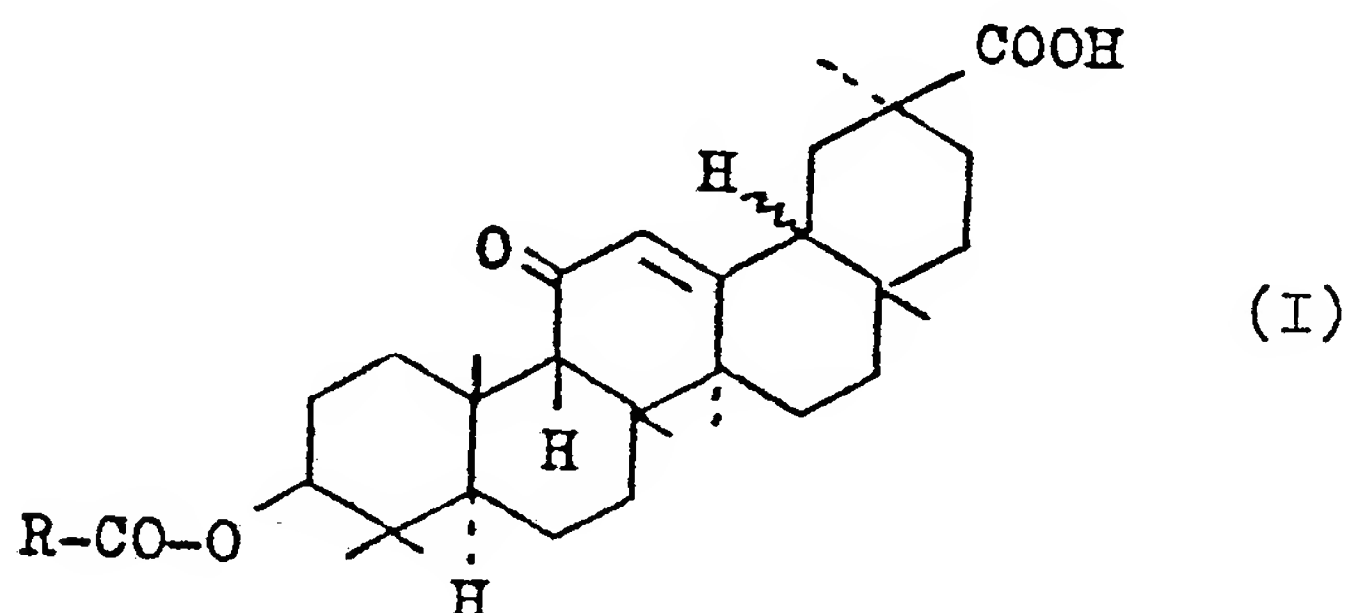
8000 MÜNCHEN 86, DEN

POSTFACH 860820

MÜHLSTRASSE 22, RUFNUMMER 983921/22

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Zubereitung für die Behandlung, Linderung oder Besserung von Krebs, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Verbindung der allgemeinen Formel (I)



worin R eine aliphatische oder cycloaliphatische Gruppe, die eine oder mehrere Carboxylgruppen enthalten kann, bedeutet, und/oder ihre pharmazeutisch annehmbaren Salze im Gemisch mit einem pharmazeutischen Verdünnungsmittel oder Träger enthält.

2. Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung in lyophilisierter oder mikronisierter Form vorliegt.
3. Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Form einer sterilen, injizierbaren Lösung vorliegt.
4. Zubereitung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Form einer Dosisseinheit vorliegt, die eine wirksame Menge an Verbindung enthält.
5. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) für die Behandlung, Linderung oder Besserung von Krebs.

PATENTANWÄLTE      DIPL.-ING. H. WEICKMANN, DIPL.-PHYS. DR. K. FINCKE  
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN, DIPL.-CHEM. B. HUBER  
DR. ING. H. LISKA

2840259

---

2

AW/ps

8000 MÜNCHEN 86, DEN 15. Sep. 1978  
POSTFACH 860820  
MÜHLSTRASSE 22, RUFNUMMER 983921/22

BIOREX LABORATORIES LIMITED

Biorex House,  
Canonbury Villas,  
London, N1 2HB, England

---

Cytostatische Mittel und ihre Verwendung

---

909813/0907

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von Neoplasmen und ebenfalls neue und nützliche cytostatische Mittel.

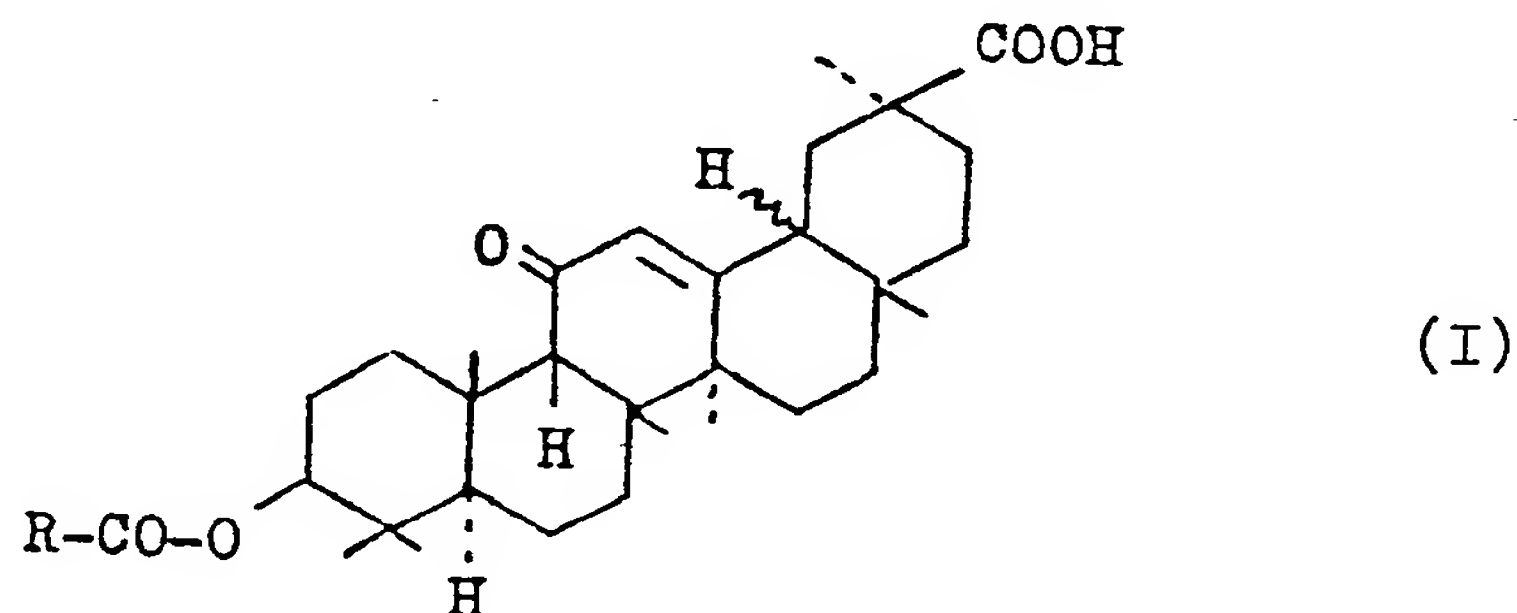
Seit vielen Jahren werden Untersuchungen zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Leukaemias gegenüber cytostatischen Mitteln mit Erfolg durchgeführt und haben klinische Anwendung gefunden. Ähnliche Untersuchungen hinsichtlich fester bzw. harter Tumoren waren weniger erfolgreich. Entweder ist es erforderlich, Tumorgewebe herzustellen und Kulturen aus einzelligen Schichten zu bilden, die niemals bestimmte Schlüsse hinsichtlich des Metabolismus der ursprünglichen Gewebe erlauben, oder die metabolischen Parameter und ihre Reaktionen gegenüber cytostatische Mitteln werden an Gewebeteilchen bestimmt, die für die Frage der Empfindlichkeit gegenüber cytostatischen Mitteln nicht relevant sind. Man muß weiterhin beachten, daß bei in vitro-Tests es im Prinzip wesentlich ist, daß der cytostatische Mechanismus der Einwirkung der chemotherapeutischen Mittel, die geprüft werden, im wesentlichen bekannt ist. Die inhibitorischen Wirkungen mit cytostatischem Einfluß eines Arzneimittels müssen wegen der metabolischen Parameter, die geprüft werden sollen, zuerst bestimmt werden. Weiterhin wurde gefunden, daß, wenn der Metabolismus der Nukleinsäuren von Tumorgewebe unter Verwendung radioaktiver Vorstufen geprüft wird, keine Inhibierung bei dem Einbau von einer einzigen Vorstufe erfolgt, was von wesentlicher Bedeutung für alle in vitro-Testergebnisse mit unterschiedlichen cytostatischen Mitteln ist.

Es wurden Untersuchungen durchgeführt zur Bestimmung der in vitro-Raten bei der Einarbeitung bzw. bei dem Einbau verschiedener  $H^3$ -markierter Vorstufen der Deoxyribonukleinsäure (DNA) in die Nukleinsäure fester, malignanter Tumoren und

zur Bestimmung des Einflusses der Inhibierung verschiedener cytostatischer Mittel auf die untersuchten Parameter. Die Versuche wurden durchgeführt, um festzustellen, ob es möglich ist, mit solchen Bestimmungen bei dem Nukleinsäuremetabolismus von Gewebeteilchen die Empfindlichkeit der festen Tumoren gegenüber cytostatischen Mitteln zu bestimmen, und ob man auf diese Art eine Orientierung für die wirksame, kombinierte chirurgische und chemotherapeutische Behandlung malignanter Tumoren zur Verfügung stellen kann.

Es wurde gefunden, daß Glycyrrhetinsäure, die in der 3-Stellung mit einer mono-, di- oder polybasischen Säure verestert ist, eine bemerkenswerte Aktivität bei der Inhibierung neoplastischen Wachstums zeigt, und somit sind diese Verbindungen wertvolle cytostatische Mittel.

Die betreffenden aktiven Verbindungen können durch die allgemeine Formel



dargestellt werden, worin R eine aliphatische oder cycloaliphatische Gruppe bedeutet, die eine oder mehrere Carboxylgruppen enthalten kann, und die pharmazeutisch verträglichen Salze davon.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind bekannt, und einige von ihnen wurden bereits topisch, enteral oder parenteral für die Behandlung inflammatorischer und ulcerativer Krankheiten verwendet.

Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und ihre Salze werden z.B. in den GB-PSen 843 133, 950 777, 1 022 968, 1 032 710 und 1 387 499 der gleichen Anmelderin beschrieben.

Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können auf übliche Weise mit den geeigneten pharmazeutischen Verdünnungsmitteln oder Trägern, Aromastoffen, Geschmacksstoffen und Farbstoffen vermischt bzw. zubereitet werden und können beispielsweise zu Tabletten oder Dragees verformt werden oder unter Zugabe geeigneter Adjuvantien in Wasser oder in Öl, z.B. Olivenöl, suspendiert oder gelöst werden. Die Verbindungen können ebenfalls in lyophilisierter oder mikronisierter Form vorliegen und mit einem geeigneten, flüssigen Träger oder Verdünnungsmittel unmittelbar vor der Verabreichung vermischt werden.

Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können oral oder parenteral im Gemisch mit festen oder flüssigen, pharmazeutischen Verdünnungsmitteln oder Trägern verabreicht werden. Es ist bevorzugt, als Injektionsmedium Wasser zu verwenden, das stabilisierende Mittel, solubilisierende Mittel und/oder Puffermittel enthält, die üblicherweise in Injektionslösungen verwendet werden. Die Injektionslösungen müssen natürlich steril sein. Zusatzstoffe dieser Art umfassen z.B. Tartrat-, Citrat- und Boratpuffer, Äthanol, Dimethylsulfoxid, komplexbildende Mittel (wie Äthylendiamin-tetraessigsäure) und Polymere mit hohem Molekulargewicht (wie flüssiges Polyäthylenoxid) für die Viskositätsregulierung.

Feste Trägermaterialien sind z.B. Stärke, Lactose, Mannit, Methylcellulose, hochdispargierte Kieselsäure, Gelatine, Agar-Agar, Calciumphosphat, Magnesiumstearat, tierische und pflanzliche Fette und feste Polymere mit hohem Molekulargewicht (wie Polyäthylenglykole). Zubereitungen, die für die orale Verabreichung geeignet sind, können gegebenenfalls Geschmacks- und/oder Süßstoffe enthalten.



Für die Behandlung von Neoplasmen bzw. Geschwülsten und insbesondere für die Behandlung verschiedener Krebsformen können die aktiven Verbindungen oral verabreicht werden. Sie können weiterhin rektal verabreicht werden, z.B. bei der Behandlung neoplastischer Krankheiten des gastro-intestinalen Trakts, oder sie können vaginal für die Behandlung neoplastischer Krankheit der Vagina oder des Uterus verabreicht werden, oder sie können durch Injektion für die Behandlung von beispielsweise neoplastischen Krankheiten der Brustdrüsen verabreicht werden.

Viele antineoplastische Mittel, die in der Vergangenheit verwendet wurden, besitzen den Nachteil, daß sie sehr störende Nebenwirkungen verursachen, wie eine Störung des gastro-intestinalen Trakts, Stomatitis, einen Brechreiz, Hautreaktionen, Alopecia, hämatopoëtische Depression und Neuropathie. Die erfindungsgemäß verwendeten aktiven Materialien ergeben keine dieser sehr unerwünschten Nebenwirkungen. Einige dieser aktiven Materialien wurden bereits in der klinischen Praxis für die Behandlung der gastro-intestinalen Störungen u.ä. häufig verwendet.

Zur Erläuterung der Wirksamkeit der erfindungsgemäß verwendeten aktiven Materialien wird eine der Verbindungen, nämlich das Dinatriumsalz von Glycyrrhetinsäure-hemisuccinat ( $R = \text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 -$ ) (das auch als Carbenoxolon-natrium bekannt ist), in vitro bei verschiedenen, malignanten, festen Tumoren geprüft. Es wurde weiterhin mit drei bekannten antineoplastischen Mitteln, nämlich Vincristin, Methotrexat und 5-Fluoruracil, verglichen. Die Wirksamkeit der Testverbindungen wird aus den Raten des Einbaus von  $\text{H}^3$ -markiertem Thymidin [bestimmt als Impulse/Minute (imp)] in malignante, harte bzw. feste Tumoren bestimmt.

Folgendes Testverfahren wurde verwendet: Eine Zellsuspension, die aus Tumoren unmittelbar nach ihrer chirurgischen Entfernung hergestellt wird, wird durch ein Sieb bzw. Filtriertuch gegossen und in gepufferter Glucoselösung (Krebs-Ringer Phosphatpuffer; pH 7,36; Glucose 300 mg%) bei 0°C suspendiert. Das überstehende Material wird abgegossen. Die Zellen werden dann in einem Inkubationsmedium suspendiert. Nach dem Färben mit Nigrosin wird der Gehalt an toten Gewebeteilchen unter dem Mikroskop bestimmt. 1 ml-Mengen dieser Suspension werden in Zentrifugengläser pipettiert, die, mit Ausnahme der Vergleichsproben, die zu prüfenden cytostatischen Mittel, gelöst in 0,1 ml Puffer (die Menge wird so berechnet, daß man die Endkonzentration erhält), enthalten. Eine Vorinkubation der Gewebeteilchen mit den unterschiedlichen cytostatischen Mitteln wird 30 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Markierungssubstanz, z.B.  $H^3$ -markiertes Thymidin (6,2 C/mMol), wird dann in einem Eisbad in einer Menge von 0,1  $\mu$ C/Glas/Assay zugegeben. In jedes Rohr wird bei einer Analyse nur eine Markierungssubstanz zur Bestimmung der Rate des Einbaus dieser Substanz gegeben. Die Markierung wird in einem Schüttelwasserbad bei 37°C 60 min weitergeführt, so daß die Gesamtdauer der Inkubation 90 min beträgt. Der pH-Wert wird bei der Analyse während der Inkubation geprüft und bei 7,3 gehalten. Bei einem konstanten pH-Wert zeigen die Gewebeteilchen lineare Einbauraten an markierten Substanzen während 2 h bei diesen Versuchsbedingungen.

Die Raten des Einbaus bei Analysen, bei denen cytostatische Mittel verwendet wurden, stehen in Beziehung zu den nichtbehandelten Vergleichsproben. Der Einbau in die letzteren wird als 100% angenommen.



Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Diese Ergebnisse werden aus drei Versuchen an einer menschlichen, oralen Carcinomazelllinie (human oral carcinoma cell line) erhalten. Diese Versuche zeigen eindeutig, daß Carbenoxolon-natrium die DNA-Synthese in einem Ausmaß von mindestens 70% unterdrückt, verglichen mit den Vergleichsproben. In der beigefügten Zeichnung sind die Ergebnisse dargestellt, die man mit Carbenoxolon-natrium bei vier verschiedenen Tumoren erhält.

Tabelle

Rate des  $H^3$ -Thymidin-Einbaus in HEP<sub>m</sub>-Zellen in der Kultur und Einfluß der cytotastischen Mittel und von Carbenoxolon auf diesen Einbau

Cytostatische Mittel	Versuch 1 N = 3		Versuch 2 N = 3		Versuch 3 N = 3	
	DPM ± SD	Anderung % Vergleich	DPM ± SD	Anderung % Vergleich	DPM ± SD	Anderung % Vergleich
Vergleich	58400 ± 22100	100	24020 ± 1900	100	38790 ± 7400	100
Vincristin	15160 ± 2690	26	16670 ± 2090	69	9080 ± 380	23
Methotrexat	19400 ± 4440	33	24450 ± 3540	102	32810 ± 1610	82
5-Fluoruracil	31300 ± 6382	54	19680 ± 190	82	17420 ± 10440	44
Carbenoxolon- natrium	2340 ± 910	4	8760 ± 1304	36	2930 ± 1800	7

009813/0907

2840259

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig, daß Carbenoxolon-natrium wesentlich wirksamer ist als Methotrexat, Vincristin und 5-Fluoruracil, und sie zeigen weiterhin, daß Carbenoxolon-natrium sehr wirksam ist bei rektalen und Uterinkrebskrankheiten und mäßig wirksam bei der Brust- und Blasenkrebs.

Kürzliche klinische Versuche haben die Wirksamkeit der aktiven Komponenten der allgemeinen Formel (I) bei der Verlängerung des Lebens von Krebspatienten im Endzustand gezeigt. In einigen Fällen wurde das Leben über mehrere Monate verlängert, gekuppelt mit einer bemerkenswerten Regression der Nebenwirkungen, die mit Krebs im Endstadium einhergehen, einschließlich Anorexia und Dyspepsia. Weiterhin trat bei der Lebensqualität der behandelten Patienten eine wesentliche Verbesserung auf.

Ende der Beschreibung.

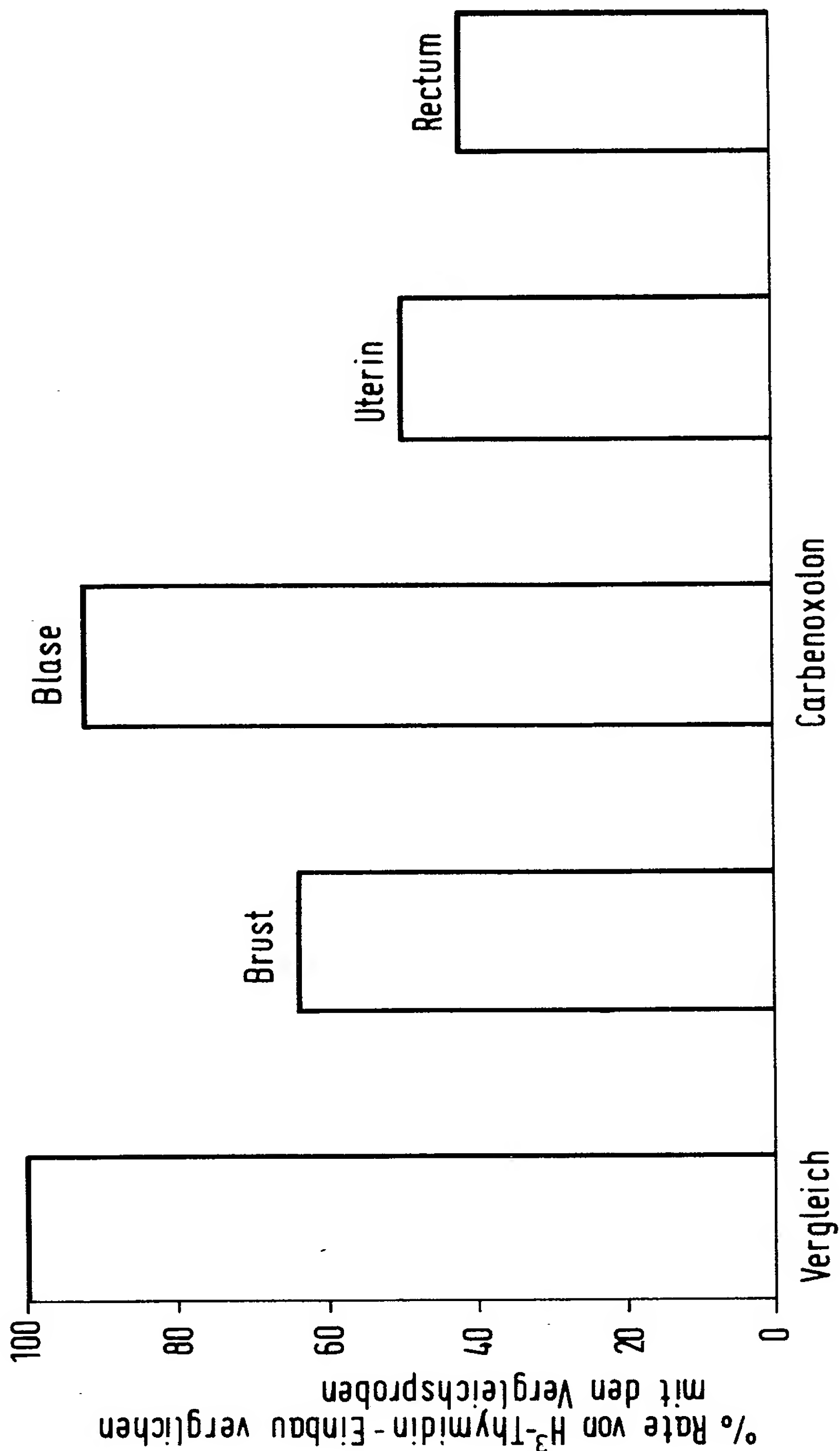
Nummer: 28 40 259  
 Int. Cl.2: A 61 K 31/215  
 Anmeldetag: 15. September 1978  
 Offenlegungstag: 29. März 1979

15.9.78

- 11 -

2840259

EINFLUSS VON CARBENOXOLON AUF  
TUMORZELLKULTUREN



ORIGINAL INSPECTED

909813/0907

BIOREX LABORATORIES LTD.